

## Anti-FLAG 标签 (DYKDDDDK) 快速免疫沉淀套装

Cat#: KIP0064

(本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗)

### 一. 背景信息

Anti-FLAG 标签 (DYKDDDDK) 快速免疫沉淀套装, 由 Anti-FLAG 亲和凝胶 (Cat#: IP0064), Mouse IgG 亲和凝胶 (Cat#: Q9001), FLAG-Tag Rabbit pAb 一抗 (Cat#: 3064), HRP 标记的羊抗兔二抗 (特异性吸附, Cat#: Q1002X) 四个成分组成, 用于快速、高效、特异的 FLAG 标签融合蛋白的免疫 (共) 沉淀。

Anti-FLAG 亲和凝胶, 由高品质的 FLAG-Tag Mouse mAb (小鼠单抗) 与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量 (至少为 0.6mg protein/ml 凝胶悬液), 高特异性, 性质稳定的特点; Mouse IgG 亲和凝胶作为 CoIP 实验对照, 性质稳定; FLAG-Tag Rabbit pAb 抗体具有高特异性, 高亲和力, 高效价的优点; HRP 标记的羊抗兔二抗经过交叉吸附纯化, 仅识别 FLAG-Tag Rabbit pAb, 与小鼠单抗的重链轻链没有交叉反应。四个成分均经严格质检, 可单独使用; 四者组合的套装则具有快速, 简便, 无干扰条带的优点。

### 二. 性能指标

- 应用范围:** 可用于 Met 修饰的 N 端 FLAG 融合蛋白 (Met-FLAG-Protein), N 端 FLAG 融合蛋白 (FLAG-Protein) 和 C 端 FLAG 融合蛋白 (Protein-FLAG) 的免疫 (共) 沉淀。
- 抗体属性:** FLAG-Tag Mouse mAb: 小鼠 IgG2a 亚型; FLAG-Tag Rabbit pAb: 兔 IgG 亚型。
- 载量:** 0.5ml Sepharose 4B 琼脂糖颗粒, 共价偶联 4mg FLAG-Tag Mouse mAb, 可纯化或沉淀至少 0.6mg Flag 融合蛋白。
- 保存方法:** -20°C 可保存 1 年。

### 三. 产品组成

名称	货号	成分	保存
Anti-FLAG 标签亲和凝胶	IP0064	共价偶联 Anti-FLAG 单抗的琼脂糖颗粒, 0.5ml 溶于 1ml PBS (含 50%甘油)	-20°C 可保存 1 年
Mouse IgG 亲和凝胶	Q9001	共价偶联小鼠 IgG 的琼脂糖颗粒, 0.5ml 溶于 1ml PBS (含 50%甘油)	-20°C 可保存 1 年
FLAG-Tag Rabbit pAb	3064	100ug 溶于 100μl PBS (含 50%甘油)	-20°C 可保存 1 年
HRP 标记的羊抗兔二抗	Q1002X	100ug 溶于 100μl PBS (含 50%甘油)	-20°C 可保存 1 年

### 四. 使用方法

#### (一) 细胞裂解液制备

- 1) 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中, 1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来, 放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。

- 2) 预冷的 PBS 重悬细胞，1000rpm 离心 3min，弃上清。重复一次。
- 3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液，（例如：T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%，一般约  $0.5-1 \times 10^7$  细胞，需要加入 1ml 细胞裂解液）。反复吹打后冰上放置 10-20min，让细胞充分裂解。
- 4) 用超声破碎仪将细胞裂解液超声，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4℃离心 10min。取上清，-80℃冷冻保存。

备注：如果待检测的 FLAG 标签蛋白质是分泌表达，不需要上述处理，浓缩后即可进行以下步骤。

## (二) 免疫 (共) 沉淀 FLAG 标签蛋白质

- 1) 重悬 Anti-FLAG 标签亲和凝胶至均一，转移 20μL 混合液(约含 10μL 凝胶)至离心管中，加入 10 倍凝胶体积 (约 100μL) PBS，5000rpm x 30sec，弃上清，重复该步骤清洗凝胶三次。对照组也按照相同的操作，只需将 Anti-FLAG 标签亲和凝胶换成小鼠 IgG 凝胶。以下步骤实验条件在对照组和实验组中同步进行。
- 2) 加入 50-200μL 含有目标蛋白的真核细胞裂解液，室温摇床孵育 2hr 或者 4℃孵育过夜。
- 3) 加入 10 倍凝胶体积 PBS，用上述离心法清洗凝胶三次；预冷的 5 倍凝胶体积 PBST 预洗液洗涤凝胶，除去非特异性结合蛋白。离心，弃上清。
- 4) 加入 5x 上样缓冲液，煮沸 5min，冷却至室温并离心。
- 5) 取上清进行 SDS-PAGE，转膜及后续的 Western Blotting 检测。

## (三) Western Blotting 检测 FLAG 标签蛋白质

- 1) 电转结束后，取膜置于膜处理液中 1 分钟，取出，室温平衡 30 分钟。
- 2) 用抗体稀释液稀释 FLAG-Tag Rabbit pAb 一抗，稀释度 1:10000，加在膜上，37℃摇床孵育 1 小时。
- 3) 摇床内用 PBST 洗膜，4 次 x 5 mins。
- 4) 用抗体稀释液稀释 HRP 标记的羊抗兔二抗，稀释度 1:10000，加在膜上，37℃摇床孵育 1 小时。
- 5) 摇床内用 PBST 洗膜，4 次 x 5 mins。
- 6) 将膜平摆在一干净平面上，取等体积的 ECL 液 A 和 ECL 液 B 混合后均匀地加到膜上，避强光反应 1min，取膜，弃去 ECL 液置于暗盒中显影。可根据背景，目的条带的强度选择不同的曝光时间。

## 五. 推荐缓冲液配方

以下配方仅为本公司推荐，客户应根据具体情况进行调整。

细胞裂解液:	150mM NaCl, 50 mM Tris-HCL(PH8.0), 1% Triton X-100, 5 mM EDTA (如有必要, 可加入其它蛋白酶抑制剂)
10xPBS (pH7.5) :	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 35.8g, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 2.8g, NaCl 89g 溶于 1L dd H <sub>2</sub> O, 加入 2% Azide (使用时须用双蒸水稀释 10 倍)
PBST	PBS 溶液中加入 0.2% Tween-20
膜处理液	甲醇
抗体稀释液	PBST + 5% 脱脂奶粉



M Input IP

Western Blotting of FLAG-Tag-fused GFP by  
Anti-FLAG FAST IP kit.

Exposure time: 5 Sec.